

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07K 13/26, C12N 15/23 A61K 37/66</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/08737</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Mai 1992 (29.05.92)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE91/00912</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 14. November 1991 (14.11.91)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 40 36 856.4 19. November 1990 (19.11.90) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstraße 54, D-8000 München 19 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SLODOWSKI, Otto [DE/DE]; Domagk-Weg 17, D-3000 Hannover 61 (DE). BÖHM, Joachim [DE/DE]; Forssmann-Weg 9, D-3000 Hannover 61 (DE). OTTO, Bernd [DE/DE]; Halberstadt 9, D-3000 Hannover 51 (DE).</p>	<p>(74) Anwalt: PATENTSTELLE FÜR DIE DEUTSCHE FORSCHUNG DER FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT; Leonrodstraße 68, D-8000 München 19 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: NEW HUMAN RECOMBINANT γ INTERFERON</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUES MENSCHLICHES, REKOMBINANTES INTERFERON GAMMA</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a new mutant of γ-IFN. This new polypeptide contains 134 amino acids. Amino acids 1 to 132 are the same as those of natural γ-interferon. The first amino acid, methionine, in the zero position is also present, as has been demonstrated by protein sequencing. The amino acid in position 133 is leucine instead of glutamine. The invention also concerns DNA sequences and plasmid DNA (DSM 6238) which codes for this new polypeptide. The invention further concerns the use of the polypeptide as a drug as well as its use as a fine-chemical reagent for <i>in vitro</i> experiments.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft eine neue Mutante des IFN-γ. Dieses neue Polypeptid enthält 134 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1 - 132 entsprechen dabei denen des natürlichen Interferons-γ. Die erste Aminosäure Methionin in Position Null ist zusätzlich vorhanden und wurde durch Proteinsequenzierung nachgewiesen. Die Aminosäure in Position 133 ist Leucin statt Glutamin. Die Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen und eine Plasmid-DNA (DSM 6238), die für dieses neue Polypeptid kodiert. Die Erfindung betrifft weiterhin noch die Verwendung des Polypeptids als Arzneimittel sowie die Verwendung des Polypeptids als Feinchemikalie für <i>in vitro</i>-Versuche.</p>		

Protein- und DNA-Sequenz der humanen IFN- γ -Variante C-101
Protein and DNA sequence of human γ -IFN variant C-101

```

0
Met
ATG

1
GlnAspProtyrValylsGluAlaGluAsnLeuLysLysPheAsnAlaGlyHisSer
20
CAAGACCATATGTATAAAGACGACGAAACCTTAAGAAATATTCTAATGCAGTCATTCA
179

AspValAlaAspAsnGlyThrLeuPheLeuGlyIleLeuLysAsnThrPheGluGlnSer
40
CATGTAGCCGATAATGCAACTCTTTCTTACGATTTCAGGAATTGCAAGACGACGACT
CATGTAGCCGATAATGCAACTCTTTCTTACGATTTCAGGAATTGCAAGACGACGACT

AspArgGlyIleMetGlnSerGlnIleValSerPheTyrPheLysLeuPheLysPhe
60
GACAGAAAATATATGACAGACCAATTTCTCTTACTTCAATTTTAAAGCTTT
GACAGAAAATATATGACAGACCAATTTCTCTTACTTCAATTTTAAAGCTTT

LysAspAspGlnSerIleGlnLysSerValGluThrIleLysGluAspMetAsnValLys
80
AAAGATGACGACGACATCCAAAGAGCTGTGAGACCATCAAGGACGATCAATGTCAG
AAAGATGACGACGACATCCAAAGAGCTGTGAGACCATCAAGGACGATCAATGTCAG

PhePheLeuSerAsnLysLysLysArgAspAspPheGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
100
TTTTCAATGCAACAAAGAAAGACGATGACTTCAAAAGCTGACTAATTATTCTGTA
TTTTCAATGCAACAAAGAAAGACGATGACTTCAAAAGCTGACTAATTATTCTGTA

ThrAspLeuAsnValGlnArgLysAlaIleIleGluLeuIleGlnValMetAlaGluLeu
120
ACTGACTTCAATGTCACCAAGCAAGCAATCATGCACTCATCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
ACTGACTTCAATGTCACCAAGCAAGCAATCATGCACTCATCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT

133
SerProAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
TCCGACGACGATCAAAACAGGAAACGAAAGGAGCTCTC TAG
574

```

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU+	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

+ Die Bestimmung der "SU" hat Wirkung in der Russischen Föderation. Es ist noch nicht bekannt, ob solche Bestimmungen in anderen Staaten der ehemaligen Sowjetunion Wirkung haben.

Beschreibung**Neues menschliches, rekombinantes
Interferon Gamma**Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft eine neue Mutante des Interferon- γ , DNA-Sequenzen und eine Plasmid-DNA, die für diese Mutante des Interferon- γ s kodieren sowie die Verwendung der Mutante für medizinische Zwecke.

Stand der Technik

Die Interferone werden in 3 Klassen eingeteilt und zwar in Interferon- α , Interferon- β und Interferon- γ .

Vor allem das Interferon- γ hat in jüngster Zeit durch seine Anwendung als Therapeutikum große Bedeutung gewonnen. Dies war vor allem dadurch möglich, daß es gelungen ist, Interferon- γ auf gentechnologischem Wege (sog. rekombinantes Interferon- γ) herzustellen.

Das auf gentechnologischem Wege hergestellte Interferon- γ enthält 144 Aminosäuren und damit eine Aminosäure, nämlich Methionin in Pos. 0, mehr als natürliches Interferon- γ mit 143 Aminosäuren.

Aufgrund der systemischen Applikation werden jedoch Interferone mit unphysiologisch hohen Konzentrationen verabreicht. Diese hohen Konzentrationen stellen hohe Anforderungen an die Formulierung der Interferone, die zudem zu einer Antigenität beitragen können.

Zur Verbesserung der therapeutischen Anwendung wäre es deshalb äußerst nützlich, wenn eine Mutante von Interferon- γ zur Verfügung stehen würde, die eine erhöhte Aktivität aufweist, so daß dann bei der Applikation mit geringeren Konzentrationen gearbeitet werden könnte. Weiterhin wäre es wünschenswert, daß diese Mutante des Interferon- γ in einer möglichst hohen Expressionsrate anfällt.

ERSATZBLATT

Aufgabe der Erfindung ist es, eine neue Mutante des Interferon- γ s anzugeben, die gegenüber den bisherigen rekombinanten Interferon- γ mit 144 Aminosäuren eine wesentlich höhere Aktivität aufweist. Aufgabe der Erfindung ist es weiterhin, DNA-Sequenzen und eine Plasmid-DNA anzugeben, die für diese Mutante kodieren, und ein Verfahren aufzuzeigen, das es ermöglicht, daß die neue Mutante in einer möglichst hohen Ausbeute anfällt.

Darstellung der Erfindung

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß DNA-Sequenzen und eine Plasmid-DNA vorgeschlagen werden, die für eine Aminosäuresequenz kodieren, die gegenüber dem bisherigen rekombinanten IFN- γ eine wesentlich erhöhte Aktivität aufweist. Dieses neue Polypeptid (im folgenden als Interferon- γ C-10L bezeichnet) enthält 134 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1 bis 132 entsprechen dabei denen des natürlichen Interferon- γ s. Die erste Aminosäure, Methionin in Position Null, ist zusätzlich vorhanden und wurde durch Proteinsequenzierung nachgewiesen. Die Aminosäure in Position 133 ist Leucin statt Glutamin. Die vollständige DNA- und Proteinsequenz ist in Figur 1 wiedergegeben. Gleichzeitig wird ein Verfahren angegeben, das es erlaubt, die Mutante in hohen Ausbeuten zu erhalten. Erfindungsgemäß wird vorgeschlagen, die Reinigung in einem sog. Batch-Verfahren durchzuführen.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß das IFN- γ C-10L eine um das 4-fach höhere Aktivität als das komplette 143 Aminosäure lange IFN- γ hat. Das IFN- γ C-10L hat zudem eine um den Faktor 24 höhere antiproliferative Aktivität als das IFN- γ und zwar auf humanen WISH-Zellen. Mit dieser gegenüber dem bekannten IFN- γ um 10 Aminosäuren verkürzten Mutante steht damit erstmals ein Interferon- γ zur Verfügung, das aufgrund seiner hohen Aktivität und seiner hohen Expressionsrate eine gezieltere und niedrigere Dosierung bei der Verwendung als Therapeutikum erlaubt. Aufgrund der hohen Expressionsrate ist es weiterhin möglich, dieses Interferon- γ auch als Feinchemikalie für in vitro-Versuche zu verwenden, z.B. als Standard für Interferonspiegelmessungen.

Im folgenden wird die neue Mutante sowie die Herstellung detailliert beschrieben.

Die Herstellung des Interferon- γ C-10L erfolgt durch Herausschneiden eines Teils des Gens und Einsetzen bzw. Einpassen in eine Plasmid-DNA hinter einem Regulationsbereich sowie Transfektion von Bakterienzellen mit dieser DNS. In einem weiteren Schritt wird IFN- γ C-10L in einem Kationenaustauscherprozeß konzentriert und in einem zweiten Schritt einer Hochreinigung unterzogen.

ERSATZBLATT

Im folgenden wird beispielhaft die Herstellung der Plasmid-DNA (Hinterlegungsnummer DSM 6238) beschrieben, die für die Interferon- γ -Variante IFN- γ C-10L kodiert.

Die Einzelschritte sind in Figur 2 dargestellt.

Als Ausgangsmaterial wurde eine cDNA verwendet, die mit Standardmethoden aus menschlichen Zellen gewonnen wurde. Diese cDNA wurde sequenziert und ist ohne Poly-A 1194 Basenpaare (Bp) lang. Sie enthält den gesamten kodierenden Bereich sowie 5' und 3' nicht translatierte Sequenzen. Für die Konstruktion des Expressionsplasmides wurden die Nukleotide 182 bis 574 verwendet.

Der 5' nicht translatierte Bereich (1 - 109) sowie die Leadersequenz des Proteins (110 - 181) wurden durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Ava II (Erkennungssequenz GGA/TCC, 181 - 185) entfernt. Das Initiationscodon ATG (für Met) sowie das Codon für die erste Aminosäure wurden durch synthetische DNA-Stücke (kommerziell erhältliche Linker) dem 5'-Ende der cDNA hinzugefügt. Dabei wurde das natürliche Codon CAG (für Gln) durch CAA (ebenfalls für Gln) ersetzt. Die dafür nötigen Einzelschritte sind allgemeiner Stand der Technik.

Der 3' nicht translatierte Bereich sowie ein Teil des codierenden Bereichs der cDNA wurden durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Hinf I (Erkennungssequenz GANTC, 571 - 575) entfernt. Die Ligation eines Linkers mit der Erkennungssequenz für Xba I (CTCTAGAG) liefert das Codon für Aminosäure 133 (Leu) sowie das Stopcodon (TAG). Die verkürzte cDNA wurde durch Ligation einer Hilfssequenz in den Expressionsvektor eingefügt.

Für die Expression von Interferon- γ in *E. coli* wurde das Plasmid pKK233-2 konstruiert von E. Amann und J. Brosius (Gene 40 (1985) 1893 - 190) verwendet. Es besitzt den induzierbaren *trc*-Promotor, eine multiple cloning site, die das Startcodon (ATG) enthält sowie Terminatoren für die RNA-Polymerase.

Diese Plasmid-DNA (Hinterlegungsnummer DSM 6238) stellt dann das Ausgangsmaterial zur Gewinnung des IFN- γ C-10L dar.

Das IFN- γ C-10L wird in Bakterienzellen (JM 105) mit einer Rate von 30% des totalen Proteins exprimiert. Zu über 90% wird dieses IFN- γ in Form von unlöslichen "inclusion bodies" abgelagert.

ERSATZBLATT

Für die Reinigung dieses IFN- γ werden Bakterienzellen nach erfolgreicher Expression aufgebrochen und die "Inclusion bodies" durch mehrfaches Waschen von löslichen bakteriellen Proteinen befreit. Das Aufbrechen wird bevorzugt mechanisch; insbesondere durch Ultraschall vorgenommen. Die "Inclusion bodies" und damit das IFN- γ werden durch einen Denaturierungsschritt mit Guanidiniumchlorid in Lösung gebracht; in einem Renaturierungsschritt durch Verdünnen in einen Phosphatpuffer wird das IFN- γ in die biologisch aktive Form gefaltet. Das dadurch zu mehr als 90% saubere IFN- γ wird durch einen Kationenaustauscherprozeß im "Batch-Verfahren" konzentriert und weiter gereinigt und erreicht durch einen weiteren Gelfiltrationsschritt einen Reinheitsgrad von mehr als 95%.

Unter einem Batch-Verfahren im Sinne dieser Erfindung wird folgendes verstanden: Das Kationenaustauschermaterial wird gleichmäßig so in einer Interferon- γ -Lösung eingerührt, daß das Interferon- γ gleichmäßig verteilt an alles Kationenaustauschermaterial bindet und die Interferon- γ -Protein-Konzentration nicht mehr als ca. 2 mg/ml gepacktes Kationenaustauschermaterial beträgt. Dieses Verfahren wird dann als Batch-Verfahren bezeichnet. Das mit Interferon- γ beladene Kationenaustauschermaterial wird auch im Batch mit Phosphatpuffer gewaschen und das Interferon- γ dann im Batch mit Kochsalzlösung in Phosphatpuffer eluiert. Als Kationenaustauscher können hier z.B. Cellulose oder Affi-Gel-Blue angewendet werden.

Dieses Batch-Verfahren bietet entscheidende Vorteile und führt zu einer Ausbeutesteigerung bei der Reinigung von IFN- γ auf 40%, verglichen mit 10% beim herkömmlichen Säulenverfahren.

Dieser Kationenaustauscherprozeß wird nämlich normalerweise mit einer Säulenchromatographie durchgeführt, d.h. das Interferon- γ wird nach dem Renaturierungsschritt in Gegenwart von z.B. 0,2 M Guanidiniumchlorid und einem Phosphatpuffer auf eine Säule mit dem Kationenaustauschermaterial gepumpt und bindet wegen der hohen Bindungskapazität des Kationenaustauschermaterials für das Interferon- γ mit dementsprechend hoher Konzentration im oberen Teil der Säule. Wegen der hohen Konzentration des gebundenen Interferon- γ sind die Elutionsausbeuten sehr gering, d.h. nur ein kleiner Teil des gebundenen Interferon- γ kann mit entsprechenden Salzlösungen von dem Kationenaustauschermaterial abgelöst werden. Demnach bietet das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber dem Stand der Technik entscheidende Vorteile.

ERSATZBLATT

Figur 1 zeigt nun die Protein- und DNA-Sequenz der humanen Interferon- γ -Variante C-10L.

Danach enthält die Interferon- γ -Mutante C-10L 134 Aminosäuren. Die erste Aminosäure (Methionin in Position Null) ist dabei zusätzlich vorhanden und wurde durch Protein-Sequenzierung bestätigt. Die Aminosäuren 1 bis 132 entsprechen denen des natürlichen Interferon- γ . Die Aminosäure in Position 133 ist Leucin statt Glutamin. Die korrekte Abfolge der Nukleotide der kodierenden Sequenz sowie der flankierenden Bereiche wurden durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Das Interferon- γ C-10L hat ein Molekulargewicht von ca. 30 000 daltons unter nativen Bedingungen und einen S-Wert von 2,5, d.h. es ist in einer dimeren Form organisiert. Unter denaturierenden Bedingungen in SDS zeigt es als ein Monomer ein MW von ca. 15 000 daltons. Der isoelektrische Punkt wurde mit 10,0 gemessen.

Das Interferon- γ C-10L hat eine spezifische antivirale Aktivität von 8×10^7 u/mg Protein (gemessen auf humanen Lungenfibroblastenkarzinomzellen A 549 mit dem EMC-Virus) und ist damit 4-fach aktiver als das komplette 143 Aminosäuren lange Interferon- γ .

Das Interferon- γ C-10L hat eine um den Faktor 24 höhere antiproliferative Aktivität als das Interferon- γ und zwar auf humanen WISH-Zellen.

Das Interferon- γ C-10L induziert die Expression des MHC Klasse II Antigens HLA-DR auf humanen Colon-Carcinomzellen um den Faktor 8 besser, als das Interferon- γ . Erstaunlicherweise ist die Rezeptorbindung des Interferon- γ C-10L auf diesen Colonzellen jedoch um den Faktor 2 schlechter als die entsprechende Rezeptorbindung des Interferon- γ . Gemessen wurde die Rezeptorbindung mit ^{32}P markiertem Interferon- γ in Wettbewerbsversuchen, in denen ^{32}P Interferon- γ mit nicht markiertem Interferon- γ oder Interferon- γ C-10L kompetiert wird und "vice versa" ^{32}P Interferon- γ C-10L mit nicht markiertem Interferon- γ bzw. Interferon- γ .

In dieser wichtigen Eigenschaft, der Rezeptorbindung, unterscheidet sich das Interferon- γ C-10L von einem von der Garotta-Gruppe beschriebenen Interferon- γ , das am COOH-Ende ebenfalls um 10 Aminosäuren verkürzt ist, das aber als endständige Aminosäure ein Glutamin an Stelle des Leucins in dem Interferon- γ C-10L trägt und eine 4-fach bessere Rezeptorbindung als Interferon- γ zeigt.

Durch die hier gezeigte Interferon- γ -Variante C-10L steht demnach erstmals eine Mutante des Interferon- γ zur Verfügung, die eine erhöhte Aktivität aufweist und die zugleich in erhöhter Ausbeute hergestellt werden kann.

ERSATZBLATT

Patentansprüche

1. Polypeptid IFN- γ C-10L mit folgender Aminosäuresequenz:

0
Met
ATG

1 20
GlnAspProTyrValLysGluAlaGluAsnLeuLysLysTyrPheAsnAlaGlyHisSer
CAAGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCA
179

40
AspValAlaAspAsnGlyThrLeuPheLeuGlyIleLeuLysAsnTrpLysGluGluSer
GATGTAGCGGATAATGGAACCTCTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGT

60
AspArgLysIleMetGlnSerGlnIleValSerPheTyrPheLysLeuPheLysAsnPhe
GACAGAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAACCTTTTTTAAAACTTT

80
LysAspAspGlnSerIleGlnLysSerValGluThrIleLysGluAspMetAsnValLys
AAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAG

100
PhePheAsnSerAsnLysLysLysArgAspAspPheGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
TTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCCGTA

120
ThrAspLeuAsnValGlnArgLysAlaIleHisGluLeuIleGlnValMetAlaGluLeu
ACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACATCAAGTGATGGCTGAACTG

133
SerProAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
TCGCCAGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCTC TAG
574

ERSATZBLATT

2. DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid mit der folgenden Aminosäuresequenz kodiert:

0
Met
ATG

1 20
GlnAspProTyrValLysGluAlaGluAsnLeuLysLysTyrPheAsnAlaGlyHisSer
CAAGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCA
179

40
AspValAlaAspAsnGlyThrLeuPheLeuGlyIleLeuLysAsnTrpLysGluGluSer
GATGTAGCGGATAATGGAACCTCTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGT

60
AspArgLysIleMetGlnSerGlnIleValSerPheTyrPheLysLeuPheLysAsnPhe
GACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCTTTTACTTCAAACCTTTTAAAAAAGCTTT

80
LysAspAspGlnSerIleGlnLysSerValGluThrIleLysGluAspMetAsnValLys
AAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAG

100
PhePheAsnSerAsnLysLysLysArgAspAspPheGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
TTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTA

120
ThrAspLeuAsnValGlnArgLysAlaIleHisGluLeuIleGlnValMetAlaGluLeu
ACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACATCCAAGTGATGGCTGAACTG

133
SerProAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
TCGCCAGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCTC TAG
574

ERSATZBLATT

3. Plasmid-DNA mit der Hinterlegungsnummer DSM 6238, die für folgende Aminosäuresequenz kodiert:

0
Met
ATG

1
GlnAspProTyrValLysGluAlaGluAsnLeuLysLysTyrPheAsnAlaGlyHisSer
CAAGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCA
179

40
AspValAlaAspAsnGlyThrLeuPheLeuGlyIleLeuLysAsnTrpLysGluGluSer
GATGTAGCGGATAATGGAACTCTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGACT

60
AspArgLysIleMetGlnSerGlnIleValSerPheTyrPheLysLeuPheLysAsnPhe
GACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCTTTTACTTCAAACCTTTTAAAAAAGCTTT

80
LysAspAspGlnSerIleGlnLysSerValGluThrIleLysGluAspMetAsnValLys
AAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAG

100
PhePheAsnSerAsnLysLysLysArgAspAspPheGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
TTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTA

120
ThrAspLeuAsnValGlnArgLysAlaIleHisGluLeuIleGlnValMetAlaGluLeu
ACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACATCCAAGTGATGGCTGAACTG

133
SerProAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
TCGCCAGCAGCTAAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCTC TAG
574

ERSATZBLATT

4. Herstellung der Plasmid-DNA nach Anspruch 3
dadurch gekennzeichnet,
daß der 5' nicht translatierte sowie ein Teil des kodierenden Bereiches einer cDNA mit 1194 Bp und 143 Aminosäuren durch Spaltung mit einer Restriktionsendonuklease entfernt wird und daß der 3' nicht translatierte Bereich sowie ein Teil des kodierten Bereiches der cDNA ebenfalls durch Spaltung mit einer Restriktionsendonuklease entfernt wird und daß dieses Gen in einem Plasmid in Bakterienzellen eingeführt wird.
5. Herstellung nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bakterienzelle E. coli ist.
6. Herstellung nach Anspruch 4 und 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Plasmid pKK233-2 ist.
7. Herstellung nach Anspruch 4 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Restriktionsendonuklease zur Abspaltung des 5' Bereiches und der Leadersequenz Ava II ist.
8. Herstellung der Plasmid-DNA nach Anspruch 4 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß Restriktionsendonuklease zur Abspaltung des 3' nicht translatierten Bereiches sowie eines Teils des kodierenden Bereiches die Restriktionsendonuklease Hinf I ist.
9. Herstellung des Polypeptides nach Anspruch 1 gekennzeichnet
durch die Kombination folgender Merkmale,
daß a) das IFN- γ C-10L aus der Plasmid-DNA nach Anspruch 3 exprimiert und
daß b) die Bakterienzellen nach erfolgreicher Expression aufgebrochen und die erhaltenen Inclusion bodies durch Waschen von löslichen bakteriellen Proteinen befreit werden und
daß c) die Inclusion bodies durch eine Denaturierung in Lösung gebracht und anschließend einem Renaturierungsschritt unterzogen werden und
daß d) das Interferon- γ C-10L gereinigt wird.

ERSATZBLATT

10. Herstellung nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Interferon- γ C-10L durch einen Kationenaustauscherprozeß im Batch-Verfahren konzentriert und anschließend durch eine Gelfiltration hochgereinigt wird.
11. Herstellung nach Anspruch 9 und 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bakterienzellen mechanisch, z.B. mit Ultraschall, aufgebrochen werden.
12. Herstellung nach Anspruch 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß beim Batch-Verfahren das Kationenaustauschermaterial in gleichmäßigen Kontakt mit der IFN- γ C-10L-Lösung gebracht wird, um eine gleichmäßige Belegung des Harzes zu erreichen, und daß anschließend im Batch gewaschen und eluiert wird.
13. Herstellung nach Anspruch 9 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Kationenaustauscher übliche Materialien, wie z.B. CM-Cellulose oder Affi-Gel-Blue, verwendet wird.
14. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 1 in der Medizin.
15. Verwendung nach Anspruch 14 als Arzneimittel.
16. Verwendung nach Anspruch 14 und 15 als Arzneimittel zur Bekämpfung von Rheuma und Nierenkrebs.
17. Verwendung des Polypeptides nach Anspruch 1 als Feinchemikalie für in vitro-Versuche, z.B. für Interferonspiegelmessung.

1 / 2

Figur 1

Protein- und DNA-Sequenz der humanen IFN- γ -Variante C-10L

0
Met
ATG

1
GlnAspProTyrValLysGluAlaGluAsnLeuLysLysTyrPheAsnAlaGlyHisSer 20
CAAGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCA
179

40
AspValAlaAspAsnGlyThrLeuPheLeuGlyIleLeuLysAsnTrpLysGluGluSer
GATGTAGCGGATAATGGAACCTCTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGT

60
AspArgLysIleMetGlnSerGlnIleValSerPheTyrPheLysLeuPheLysAsnPhe
GACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCTCTTTTACTTCAAACCTTTTAAAACTTT

80
LysAspAspGlnSerIleGlnLysSerValGluThrIleLysGluAspMetAsnValLys
AAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAG

100
PhePheAsnSerAsnLysLysLysArgAspAspPheGluLysLeuThrAsnTyrSerVal
TTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTA

120
ThrAspLeuAsnValGlnArgLysAlaIleHisGluLeuIleGlnValMetAlaGluLeu
ACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCATCCAAGTGATGGCTGAACTG

133
SerProAlaAlaLysThrGlyLysArgLysArgSerLeu
TCGCCAGCAGCTAAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCTC TAG
574

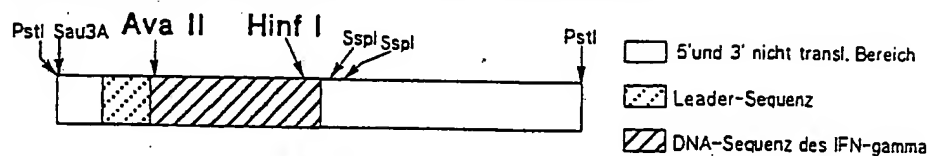
ERSATZBLATT

- 2 / 2

Figur 2

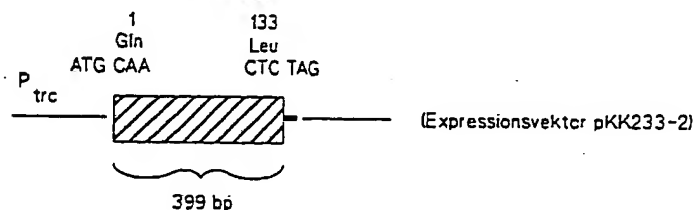
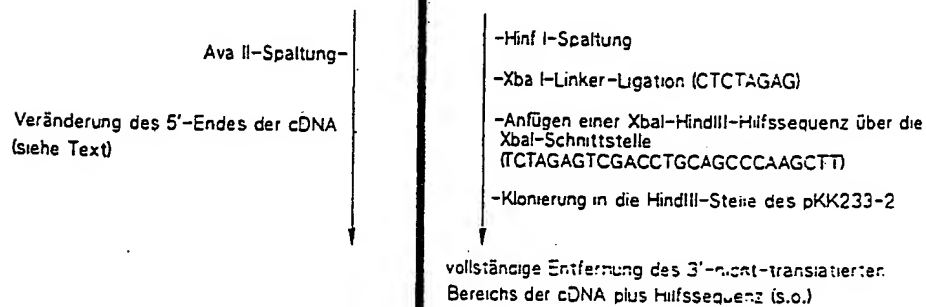
Konstruktion eines Expressionsplasmids zur Expression des IFN-gamma C-10L

Humane IFN-gamma cDNA (1194 Bp) in PstI-Stellen des pBR322 eingebaut



Modifikation des 5'-Endes

Modifikation des 3'-Endes



ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/DE91/00912

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl.5 C07K 13/26, C12N 15/23, A61K 37/66		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl.5	C07K; C12N; A61K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A2, 0306870 (BASF AKTIENGESellschaft) 15 March 1989; see claim 1	1-17
Y	---	1-17
X	EP, A1, 0256424 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) 24 February 1988; see claim 2	1-17
Y	---	1-17
Y	EP, A1, 0170917 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 12 February 1986; see claim 9	1-17
A	EP, A2, 0166993 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 8 January 1986; see the whole document	1-17
X	EP, A2, 0146354 (GENENTECH, INC.) 26 June 1985 see claim 20	1-17
Y	---	1-17

<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
26 February 1992 (26.02.92)	20 March 1992 (20.03.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/DE 91/00912**

SA 53642


This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 30/12/91. The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A2- 0306870	15/03/89	AU-D- 2203688	16/03/89
		DE-A- 3730331	30/03/89
		JP-A- 1095791	13/04/89
EP-A1- 0256424	24/02/88	AU-B- 607930	21/03/91
		AU-D- 7668687	19/05/88
		DE-A- 3773295	31/10/91
		JP-A- 63049098	01/03/88
		ZA-A- 8705819	15/02/88
EP-A1- 0170917	12/02/86	AU-B- 586822	27/07/89
		AU-D- 4474985	16/01/86
		JP-A- 61024599	03/02/86
		US-A- 4898931	06/02/90
EP-A2- 0166993	08/01/86	AU-D- 4321985	12/12/85
		US-A- 4855409	08/08/89
		WO-A- 85/05618	19/12/85
		WO-A- 85/05619	19/12/85
EP-A2- 0146354	26/06/85	AU-B- 597872	14/06/90
		AU-D- 3663584	20/06/85
		JP-A- 3201979	03/09/91
		JP-A- 60202899	14/10/85
		OA-A- 7902	20/11/86
		US-A- 4855238	08/08/89

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 91/00912

I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁵ Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.5 C 07 K 13/26, C 12 N 15/23, A 61 K 37/66		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoß ⁷		
Klassifikationssystem Int.Cl.5	Klassifikationssymbole C 07 K; C 12 N; A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	EP, A2, 0306870 (BASF AKTIENGESellschaft) 15 März 1989, Siehe Anspruch 1	1-17
Y	--	1-17
X	EP, A1, 0256424 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) 24 Februar 1988, Siehe Anspruch 2	1-17
Y	--	1-17
Y	EP, A1, 0170917 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 12 Februar 1986, Siehe Anspruch 9	1-17
	--	
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
26. Februar 1992	20. 03. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 Name: Wolfgang	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP, A2, 0166993 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 8 Januar 1986, siehe Dokument insgesamt.	1-17
X	EP, A2, 0146354 (GENENTECH, INC.) 26 Juni 1985, Siehe Anspruch 20	1-17
Y		1-17

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/DE 91/00912**

SA 53642

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am 30/12/91.
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A2- 0306870	15/03/89	AU-D- 2203688	16/03/89
		DE-A- 3730331	30/03/89
		JP-A- 1095791	13/04/89
EP-A1- 0256424	24/02/88	AU-B- 607930	21/03/91
		AU-D- 7668687	19/05/88
		DE-A- 3773295	31/10/91
		JP-A- 63049098	01/03/88
		ZA-A- 8705819	15/02/88
EP-A1- 0170917	12/02/86	AU-B- 586822	27/07/89
		AU-D- 4474985	16/01/86
		JP-A- 61024599	03/02/86
		US-A- 4898931	06/02/90
EP-A2- 0166993	08/01/86	AU-D- 4321985	12/12/85
		US-A- 4855409	08/08/89
		WO-A- 85/05618	19/12/85
		WO-A- 85/05619	19/12/85
EP-A2- 0146354	26/06/85	AU-B- 597872	14/06/90
		AU-D- 3663584	20/06/85
		JP-A- 3201979	03/09/91
		JP-A- 60202899	14/10/85
		OA-A- 7902	20/11/86
		US-A- 4855238	08/08/89

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.